241-09606

SHIMADZU

VT•SAL•IPA Ver.2

Ampdirect® Technology

腸管系病原菌遺伝子検出試薬キットVer.2

Intestinal Pathogen Gene Detection Kit Ver.2

P/N:241-09600-91

取扱説明書

この文書をよく読んで正しくご使用ください。
いつでも使用できるように大切に保管してください。

特長

■腸管出血性大腸菌（VT 遺伝子）、サルモネラ属菌（エンテロトキシン遺伝子）、赤痢菌（ipaH 遺伝子）に由来する遺伝子をマルチプレックス PCR と融解曲線解析により一度に検出できます。
■PCR 増幅から遺伝子検出まで 1 本のチューブで手間なく行えます。
■偽陰性対策として内部コントロール DNA（I.C.）を含んでいます。

試薬構成

No.	試薬名称	キャップ	本数	液量
①	PCR Reagent	黄	8 本	1.08 mL
②	PCR Enzyme	透明	1 本	50 µL

使用回数:192 tests 保存温度:-20 ℃ 使用期限:包装袋のラベルに記載

キット以外に必要な機器・消耗品・試薬

■機器・消耗品
1) リアルタイム PCR 装置
2) 恒温装置（1.5 mL チューブが使用できるもの）
3) 高速遠心機（1.5 mL チューブを 10,000 rpm で遠心可能なもの）
4) マイクロピペットおよびフィルター付チップ
5) 小型遠心機（スピンダウン用）
6) ボルテックスミキサー
7) 氷（クラッシュアイス）および冷却用アルミブロック
8) PCR 反応チューブ（リアルタイム PCR 用）
9) 1.5 mL チューブ
10) マスターミックス調製用チューブ ※1

■試薬
11) 125 × SYBR® Green I 溶液 ※2
12) 15 ～ 25 µM ROX リファレンス色素 ※3
13) 1 × TE 緩衝液
14) 蒸留水

◎：必要、○：必要な場合のみ

※1：反応数に応じて、適切なものを用意してください。
例）24 反応の場合：1.5 mL チューブ、48 反応の場合：5 mL チューブなど。
※2：125 × SYBR® Green I 溶液は用時調製してください。
ここでは Thermo Fisher Scientific 社製『SYBR® Green I nucleic acid gel stain』(10,000×)を TE にて 80 倍希釈（125×）した溶液を使用しています。
SYBR® Green I は、Thermo Fisher Scientific 社が特許を保有しています。正当権利者より購入してください。
※3：ROX 補正が必要な装置を使用の場合のみ用意してください。
Thermo Fisher Scientific 社製『ROX Reference Dye』を推奨します。

操作方法

使用上の注意

- 本取扱説明書および SDS に従って正しく使用してください。
- ①PCR Reagent は必要な本数を室温にて解凍後、転倒混和またはボルテックスミキサーなどで、**しっかり混和**してスピンダウンし、**使用時まで氷冷下で保存**してください。
- ②PCR Enzyme は**使用時まで冷凍（-20℃）保存**してください。
- 試薬の劣化を防ぐために、凍結融解を過度に繰り返すことは避けてください。
- 操作中にチューブ内で液が飛び散った場合は、スピンダウンしてから使用してください。
- 機器は、それぞれの製品に付属する取扱説明書などに従って、正しく使用してください。

1 検体処理

(1) 検便（例：検便容器の採便棒先端に付着した便）を、蒸留水または 1 × TE 緩衝液 50 µL を入れた 1.5 mL チューブ内で、5 %(w/v) 程度の濃度に懸濁します。
(2) 恒温装置で 90℃、5 分間の加熱処理を行います。
(3) 10,000 rpm、5 分間の遠心分離を行います。
(4) 沈渣が混入しないように 5 µL の上清を回収し、PCR 反応に使用します。

2 反応試薬調製

(1)、(2)の作業は
必ず氷冷下で行ってください。

(1) マスターミックス調製用チューブで、マスターミックスを調製します。
（必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします）

マスターミックス組成（1 反応分）

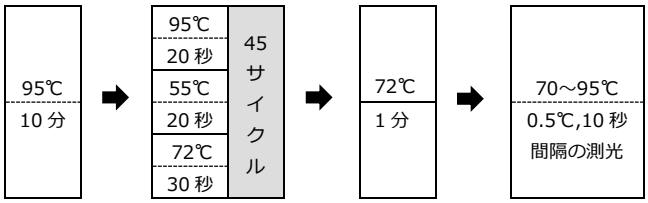
① PCR Reagent	:	44 µL
② PCR Enzyme	:	0.25 µL
125 × SYBR® Green I	:	1 µL
(必要な場合) ROX リファレンス溶液	:	1 µL
Total	:	45.25 µL
(ROX 溶液添加の場合	:	46.25 µL)

(2) **1** で処理した 5 µL の検体が入った PCR 反応チューブに、(1)のマスターミックスを 45 µL(ROX 溶液添加の場合 46 µL)添加します。

3 PCR 増幅・融解曲線解析

リアルタイム PCR 装置にて、PCR 増幅と融解曲線解析を行います。
設定条件は以下のとおりです。

PCR 増幅条件／融解曲線解析条件



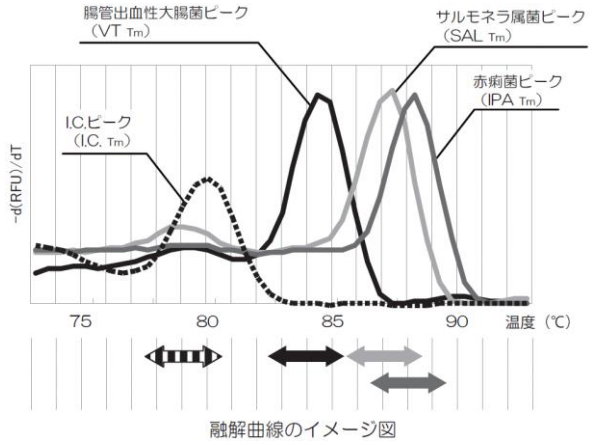
3 解析

島津製作所製 遺伝子検出装置 GVP-9600 によるピーク検出例 ※1

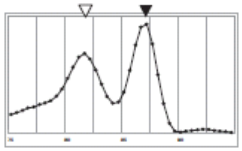
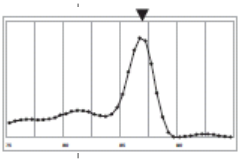
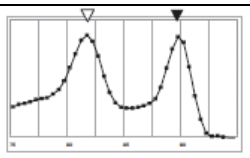
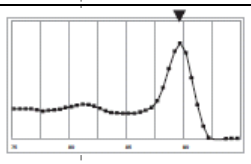
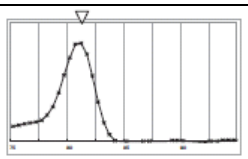
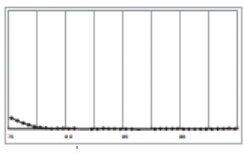
						(℃)
■	腸管出血性大腸菌	:	82.5	≦	VT ^{Tm}	≦ 85.5 ※2
■	サルモネラ属菌	:	85.5 ※2	<	SAL ^{Tm}	≦ 88.5
■	赤痢菌	:	86.5	≦	IPA ^{Tm}	≦ 89.5
▮▮▮	I.C.	:	77.5	≦	I.C. ^{Tm}	≦ 80.5

※1： お使いの装置によって、ピーク検出温度範囲が上記と異なる場合があります。他社装置を使用している場合は、お客様自身でその装置に合わせた陽性または陰性の判断基準の検討が必要です。

※2： 85.5 ℃付近のピークが検出された場合は、I.C. ピークとの位置関係から腸管出血性大腸菌のピークかサルモネラ属菌のピークかを判断してください。



融解曲線のイメージ図

		I.C のピーク（▽）		解析結果	次工程
		77.5 - 80.5 ℃	ピークなし		
腸管系病原菌遺伝子のピーク（▼）	82.5 - 85.5 ℃			腸管出血性大腸菌 陽性疑い検体	確認培養試験へ （CT-SMAC 培地など）
	85.5 - 89.5 ℃			サルモネラ属菌または 赤痢菌陽性疑い検体	確認培養試験へ （SS 培地など）
	ピークなし			陰性検体	終了
	ピークなし			解析不能 検体由来の阻害か、試薬の劣化が疑われます。	再測定へ 阻害の場合は検便懸濁液を 10 倍希釈してください。

注意事項

1. 試薬に関する注意事項
   - **本製品は研究用です。**医療行為や診断目的には使用できません。また、医療品・化粧品・食品として、人や動物の身体に使用できません。
   - 本取扱説明書および SDS に従って正しくお使いください。SDS の入手は当社までお問合わせください。
   - 本製品は弊社試験条件にて、腸管系病原菌（腸管出血性大腸菌・サルモネラ属菌・赤痢菌）の 3 種について、概ね 100 copies/反応の検出感度を確認しています。
     ただし、検体中の菌量や夾雑物の多寡などによって検出されない場合があります。

2. 廃棄に関する注意事項
   - PCR 後の反応チューブのふたはしっかりと閉じて廃棄してください。
   - 廃棄の際にオートクレーブは行わないでください。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルが発生して汚染原因となる可能性があります。
   - 廃棄物は、法令や自治体等の条例・規制等に従って適切に廃棄してください。

3. その他
   - 本取扱説明書に記載の会社名・商品名は各社の商標の場合があります。本文中では一部®・TM を省略しています。
   - Ampdirect®は㈱島津製作所の登録商標です。
   - SYBR®は、Thermo Fisher Scientific 社の登録商標です。
   - 本取扱説明書の著作権は㈱島津製作所が保有します。当社の許可無く内容の一部または全部を転載・複製することはできません。

参考文献

西村直行、高岡直子、馬場洋一、林田瑞穂、伊藤武
混合糞便からの直接 PCR による食中毒菌核酸検査に向けた検討.
感染症学雑誌　2012: 86 (6): 741-8

技術的な内容に関するお問合せ窓口
株式会社島津製作所
分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット　TEL:075-823-1351
http://www.an.shimadzu.co.jp/general/contact/contact.htm

© 2015 Shimadzu Corporation. All rights reserved.